

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
30 août 2001 (30.08.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/62909 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C12N 15/11, A61K 31/7088, 39/39 // A61P 37/04

(74) Mandataires : KERNEIS, Danièle etc.; Aventis Pasteur,
Direction de la Propriété Intellectuelle, 2, avenue pont Pas-
teur, F-69007 Lyon (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/00349

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GR, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Date de dépôt international : 7 février 2001 (07.02.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/02057 18 février 2000 (18.02.2000) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : AVEN-
TIS PASTEUR [FR/FR]; 2, avenue pont Pasteur, F-69007
Lyon (FR).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : BACHY,
Monique [FR/FR]; Domaine de la Roche, F-69440 Saint
Maurice/Dargoire (FR). SODOYER, Régis [FR/FR]; 5,
rue du Brulet, F-69110 Sainte-Foy-lès-Lyon (FR). TRAN-
NOY, Emanuelle [FR/FR]; 26c, rue des Socurs Bouvier,
F-69005 Lyon (FR).

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: IMMUNOSTIMULATORY OLIGONUCLEOTIDES

(54) Titre : OLIGONUCLEOTIDES IMMUNOSTIMULANTS

(57) Abstract: The invention concerns an oligonucleotide capable of stimulating human cells of an immune system, characterised in that it comprises at least a nucleotide sequence corresponding to formula 5' GAGAATTCCTTTACCTTTTAT3', wherein T represents Thymine, A Adénine, C Cytosine, and G Guanine, and it does not include CG dinucleotide wherein the Cytosine C is unmethylated. Said oligonucleotide is particularly useful as vaccine adjuvant.

(57) Abrégé : L'invention concerne un oligonucléotide capable de stimuler des cellules humaines du système immunitaire, caracté-
risé en ce qu'il comprend au moins une séquence nucléotidique ayant la formule suivante: 5' GAGAATTCCTTTACCTTTTAT3', dans
laquelle T signifie Thymine, A Adénine, C Cytosine, et G Guanine, et en ce qu'il est dépourvu de dinucléotide CG dans lequel la
Cytosine C n'est pas méthylée. Un tel oligonucléotide trouve une application particulièrement intéressante comme adjuvant vaccinal.

BEST AVAILABLE COPY

WO 01/62909 A1

OLIGONUCLEOTIDES IMMUNOSTIMULANTS

La présente invention est relative au domaine des immunostimulants. Plus particulièrement, l'invention concerne des oligonucléotides capables de stimuler des
5 cellules humaines intervenant dans le système immunitaire, et à leur utilisation comme adjuvant vaccinal.

Un grand nombre d'oligonucléotides ont déjà été décrits dans l'art antérieur, en relation avec leurs propriétés immunostimulantes. Ainsi, la demande EP 0 468 520
10 décrit des polynucléotides immunostimulants constitués par un simple brin d'ADN linéaire comprenant de 10 à 100 nucléotides s'enchaînant selon une séquence palindromique.

Selon la demande WO 96/02 555, l'activité immunostimulatrice d'oligonucléotides est
15 liée à la présence d'une séquence dinucléotique 5' CG 3', dans laquelle C n'est pas méthylée, l'activité immunostimulante étant plus forte si le motif CG est précédé en 5' du dinucléotide GA et / ou suivi en 3' du dinucléotide TC ou encore TT.

Au contraire, selon la demande de brevet WO 98/52 962, il n'est pas nécessaire que
20 la séquence de l'oligonucléotide soit un palindrome, ni qu'elle comprenne le dinucléotide CG ; en effet, les 3 nucléotides décrits dans cette demande pour une utilisation en tant qu'adjuvant vaccinal ont les séquences suivantes : 5' GACGTT 3', 5' GAGCTT 3', ainsi que 5' TCCGGA 3'.

25 Selon le brevet US 5,663,153, l'activité immunostimulante d'oligonucléotides n'est pas liée à la séquence des nucléotides, mais à la nature de la liaison entre nucléotides, la présence d'au moins une liaison phosphorothioate permettant d'induire une réponse locale du système immunitaire.

30 La plupart des tests de l'art antérieur pour évaluer l'activité immunostimulante des oligonucléotides proposés, sont effectués soit in vitro sur des cellules animales (essentiellement des cellules murines), soit in vivo sur des souris. Cependant, les

différences existant entre le système immunitaire de la souris et celui de l'être humain, ont conduit à des différences entre les résultats obtenus sur des cellules murines et ceux obtenus sur des cellules humaines.

Or l'industrie pharmaceutique a un grand besoin d'immunostimulants pouvant être administrés à l'homme, notamment dans le domaine des vaccins.

La présente invention a donc pour but de proposer des oligonucléotides capables de stimuler des cellules du système immunitaire de l'être humain.

Pour atteindre ce but, l'invention a pour objet un oligonucléotide capable de stimuler des cellules humaines du système immunitaire caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence 5' GAGAATTCTTTACCTTTTAT 3' dans laquelle T est la Thymine, A est l'Adénine, C est la Cytosine, et G la Guanine, et en ce qu'il est dépourvu de dinucléotide CG dans lequel la Cytosine C ne serait pas méthylée.

Selon une caractéristique de l'invention, l'oligonucléotide comprend de 15 à 100 nucléotides.

Selon une autre caractéristique, l'oligonucléotide selon l'invention est capable d'induire la prolifération des lymphocytes humains.

Selon une autre caractéristique, l'oligonucléotide selon l'invention est capable d'accroître l'expression des marqueurs d'activation CD25, CD69 et CD86 sur les lymphocytes B humains.

L'invention concerne également l'utilisation d'un tel oligonucléotide pour la fabrication d'un médicament.

L'invention a également pour objet un adjuvant vaccinal caractérisé en ce qu'il comprend au moins un oligonucléotide capable de stimuler des cellules humaines du système immunitaire possédant au moins une séquence

5' GAGAATTCTTTACCTTTTAT 3' dans laquelle T est la Thymine, A est l'Adénine, C est la Cytosine, et G la Guanine, et en ce qu'il est dépourvu de dinucléotide CG dans lequel la Cytosine C ne serait pas méthylée.

L'invention a également pour objet une composition vaccinale à usage humain
5 comprenant au moins un antigène vaccinal caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un oligonucléotide capable de stimuler des cellules humaines du système immunitaire possédant au moins une séquence

5' GAGAATTCTTTACCTTTTAT 3' dans laquelle T est la Thymine, A est l'Adénine, C est la Cytosine, et G la Guanine, et en ce qu'il est dépourvu de
10 dinucléotide CG dans lequel la Cytosine C ne serait pas méthylée .

La présente invention sera mieux comprise à la lecture de la description qui va suivre, en référence aux figures 1 et 2 qui illustrent les résultats obtenus lors des tests décrits aux exemples 1 et 2.

15

Par oligonucléotide au sens de la présente invention, on entend un polynucléotide comprenant au moins 15 nucléotides. La limite supérieure de la taille des oligonucléotides n'est pas vraiment déterminée. On peut cependant noter que, plus l'oligonucléotide sera long, plus sa purification sera difficile à effectuer lors des étapes
20 de synthèse , et plus le prix de revient en sera élevé. D'autre part, il est probable qu'un oligonucléotide de grande longueur aura plus de difficultés à pénétrer dans les cellules. Aussi, pour les besoins de la présente invention, on considère qu'une limitation de la taille de l'oligonucléotide à 100 nucléotides est appropriée. Cet oligonucléotide est de préférence un oligonucléotide simple brin; il peut s'agir d'un
25 oligodésoxyribonucléotide ou d'un oligoribonucléotide. On a obtenu de particulièrement bons résultats en utilisant un oligodésoxyribonucléotide. Les oligonucléotides convenant aux fins de l'invention peuvent se présenter sous forme de phosphodiester ou, afin d'être plus stables, sous forme de phosphorothioates ou d'hybrides phosphodiester / phosphorothioates. Les oligonucléotides
30 phosphorothioates sont ceux préférés.

L'oligonucléotide selon l'invention est capable de stimuler des cellules humaines du système immunitaire, telles que les lymphocytes B, les lymphocytes T, les monocytes et les cellules dendritiques. Cette stimulation est appréciée notamment par la lymphoprolifération ou par l'expression de marqueurs d'activation, tels que les marqueurs CD25, CD69 et CD86 sur les lymphocytes B. Il est possible de sélectionner les oligonucléotides d'intérêt au moyen de tests différents de ceux proposés dans la présente demande, à condition cependant qu'il s'agisse de tests évaluant la capacité de stimulation de cellules humaines, et non pas comme dans la plupart des documents de l'art antérieur, de tests évaluant la capacité de la stimulation de cellules murines. Il serait notamment possible de tester l'expression d'autres marqueurs d'activation des lymphocytes, ou l'expression de marqueurs de prolifération tels que le marqueur KI67; des tests relatifs à l'augmentation des marqueurs d'activation et de maturation des cellules dendritiques pourraient également être utilisés. De même, des tests permettant l'appréciation de l'augmentation de production de certaines cytokines peuvent également être utilisés.

Selon une caractéristique de l'invention, l'oligonucléotide comprend au moins une séquence nucléotidique 5' GAGAATTCTTTACCTTTTAT 3' dans laquelle T signifie Thymine, C Cytosine, G Guanine, et A Adénine. Cette séquence peut être 5' terminale, 3' terminale ou être entourée par d'autres nucléotides. Elle peut être unique ou répétée plusieurs fois à l'identique à l'intérieur d'un même oligonucléotide

Selon l'invention, l'oligonucléotide ne comporte pas forcément de séquence palindromique. Malgré cette absence de séquence palindromique, un tel oligonucléotide est capable de stimuler des cellules humaines du système immunitaire.

Selon une caractéristique, l'oligonucléotide selon l'invention est dépourvu de dinucléotide CG dans lequel la Cytosine ne serait pas méthylée. La capacité des oligonucléotides de l'art antérieur à être immunostimulants a presque toujours été interprétée comme liée à la présence de motifs CpG non méthylés (Cf. notamment l'article de Krieg et al dans Nature d'avril 1995 cité ci-dessus), cette interprétation étant en cohérence avec l'observation selon laquelle la fréquence de ce dinucléotide

était environ 4 fois plus importante dans le génome des bactéries que dans celui des vertébrés. De façon surprenante, on a maintenant trouvé que des oligonucléotides entièrement dépourvus de ce motif dinucléotidique étaient cependant parfaitement capables de stimuler les cellules du système immunitaire humain.

5

Selon une caractéristique particulière, l'oligonucléotide selon l'invention est dépourvu ou appauvri en séquence nucléotidique capable d'inhiber les cellules du système immunitaire humain. En effet, afin d'obtenir un effet global immunostimulant, si des motifs inhibiteurs ou neutralisants tels que, par exemple, ceux décrits dans la
10 demande WO 98/52 581 sont présents, il faut que leur effet soit supprimé ou réduit, grâce à la présence d'une séquence à effet immunostimulant plus prononcé, ou grâce à la présence d'un plus grand nombre de séquences selon l'invention.

La présente invention a également pour objet un adjuvant vaccinal comprenant au
15 moins un oligonucléotide immunostimulant ayant au moins un motif 5' GAGAATTCTTTACCTTTTAT 3' tel que mentionné ci-dessus. Par adjuvant vaccinal, on entend un produit qui permet d'accroître ou de modifier la réponse du système immunitaire d'un organisme vis à vis de l'administration d'un antigène. En particulier, il peut s'agir d'une augmentation de la réponse humorale ou de la réponse
20 cellulaire.

L'action d'un adjuvant vaccinal peut également être, non pas une augmentation de la réponse qui se produirait en l'absence d'adjuvant, mais une orientation différente de la réponse produite : par exemple, orientation vers une réponse cellulaire plutôt qu'une réponse humorale, production de certaines cytokines plutôt que d'autres, production
25 de certains types ou sous-types d'anticorps plutôt que d'autres; stimulation de certaines cellules plutôt que d'autres, etc...

L'oligonucléotide immunostimulant de la présente invention peut être utilisé comme adjuvant vaccinal quelle que soit la nature de l'antigène administré et quel que soit le
30 nombre de valences utilisées. Il peut être le seul adjuvant utilisé ou, au contraire, être un élément d'une combinaison adjuvante.

L'action adjuvante de l'oligonucléotide selon l'invention peut être obtenue, soit lorsqu'il est associé à l'antigène ou aux antigènes lors de leur administration, i.e. lorsqu'ils font partie de la même composition vaccinale, soit lorsqu'il est administré séparément de l'antigène ou des antigènes. On préfère cependant l'utiliser dans la même composition vaccinale que l'antigène ou les antigènes à administrer.

L'oligonucléotide selon l'invention peut avantageusement être administré par toutes les voies susceptibles d'être utilisées pour une composition vaccinale: voie muqueuse ou voie systémique.

- 10 L'un des objets de l'invention est une composition vaccinale comprenant au moins un oligonucléotide immunostimulant ayant une séquence
5' GAGAATTCTTTACCTTTTAT 3' telle que décrite ci-dessus.

Une composition vaccinale selon l'invention peut être destinée à l'immunisation contre une seule maladie, ou destinée à l'immunisation contre plusieurs maladies. Il peut s'agir d'une composition vaccinale liquide ou lyophilisée. Elle peut comprendre, outre les antigènes, tout ou partie des composants habituellement présents dans un vaccin : tampons, stabilisants, conservateurs, ... Elle peut également comprendre un ou plusieurs adjuvant(s) autre(s) que ceux objets de la présente invention. Elle peut également comprendre plusieurs adjuvants objets de la présente invention, constitués soit par des oligonucléotides ayant tous le même motif
5' GAGAATTCTTTACCTTTTAT 3' mais se différenciant par les nucléotides en 5' et/ou en 3', soit par des oligonucléotides ayant des motifs 5' GAGAATTCTTTACCTTTTAT 3' différents, dont les séquences en 5' et en 3' sont identiques ou différentes.

25 La composition vaccinale selon l'invention peut être destinée à une administration prophylactique ou à une administration thérapeutique.

La composition vaccinale selon l'invention peut être formulée de manière à optimiser l'action adjuvante de l'oligonucléotide objet de l'invention. Ainsi, l'oligonucléotide peut être couplé à un lipide, tel que le cholestérol ; il peut être intégré dans une émulsion de type huile / eau ou formulé sous forme de liposomes.

Les exemples qui suivent illustrent des modes de réalisation particuliers de la présente invention.

5 Exemple 1 :

Synthèse des oligonucléotides

On prépare un oligonucléotide dont la séquence est la suivante:

5' GAGAATTCTTTACCTTTTAT 3'.

10 La synthèse est réalisée au moyen d'un automate synthétiseur fourni par Applied Biosystems qui met en œuvre la méthode chimique standard au phosphoramidite et qui comporte à chaque cycle une étape d'oxydation, qui est réalisée au moyen d'une solution tétraéthylthiuram / acétonitrile pour obtenir une liaison phosphorothioate.

15 On prépare en outre, de la même façon, un oligonucléotide A15(S) qui ne comprend que des A et qui est phosphorothioate sur toute sa longueur. Cet oligonucléotide est un témoin négatif car il n'entraîne ni prolifération ni augmentation de l'expression des marqueurs d'activation sur les lymphocytes B.

20 On prépare également un oligonucléotide 1d(S) dont la séquence est identifiée dans la demande de brevet WO96/02555 et est la suivante: 5' GCATGACGTTGAGCT 3'; cet oligonucléotide comporte des liaisons phosphorothioates sur toute sa longueur et est utilisé comme témoin positif.

25 Tous les oligonucléotides sont maintenus en solution dans du tampon PBS

Exemple 2 :

Test de Lymphoprolifération

30 On isole des lymphocytes à partir du sang périphérique d'un donneur, en procédant à une centrifugation sur un gradient de Ficoll. Ces lymphocytes sont ajustés à

4.10⁵ cellules / ml dans du milieu de culture AIMV additionné de Glutamine, de Streptomycine et de Pénicilline.

Les cellules sont distribuées en plaques 96 puits (fond rond) sous 100 µl, soit
5 2.10⁵ cellules par puits. On ajoute ensuite 100µl d'une solution 4µM (ou d'une solution 0.8µM, ou encore d'une solution 0.16µM) des oligonucléotides à tester produits à l'exemple 1 (1 seul type d'oligonucléotide par puits) afin d'obtenir une concentration finale soit de 2 µM, soit de 0.4µM, soit de 0.08µM.

10 Après incubation 3 jours d'incubation à 37°C en atmosphère humide à 5% de CO₂, on ajoute de la thymidine tritiée (Amersham TRK 120) préalablement diluée dans du milieu de culture, à raison de 1 µCi par puits sous 50 µl. Après 7 à 8 heures d'incubation à l'étuve (5% CO₂, 37°C), les plaques peuvent être congelées à -80°C et traitées plus tard.

15 A l'aide du "Harvester", on récolte le contenu des puits sur des plaques Unifilter GF/C et on réalise 6 lavages en eau distillée puis un lavage en éthanol 70% afin de précipiter l'ADN.

Après séchage des plaques, 25 µl de liquide scintillant (Microscint-40, Packard) sont distribués dans chaque puits et permettent de quantifier la radioactivité (rayonnements
20 émis par le tritium) en mesurant le nombre de coups / minute (cpm) émis par chaque puits sur le compteur Top Count (Packard).

Les résultats obtenus pour chacun des oligonucléotides testés sont représentés sur la figure 1, qui indique, pour chaque oligonucléotide testé l'indice de stimulation IS.

25 Cet indice IS est calculé de la façon suivante:

$$IS = \frac{\text{CPM de l'oligonucléotide testé} - \text{CPM du contrôle milieu}}{\text{CPM contrôle milieu}}$$

On remarque que l'oligonucléotide selon l'invention (3DbTT) qui ne comprend pas de dinucléotide CG est capable d'induire une prolifération des lymphocytes humains identique à celle mesurée pour l'oligonucléotide de l'art antérieur (3Db) comprenant un
30 dinucléotide CG. Par contre, les résultats du contrôle négatif (A15) sont bien négatifs.

Exemple 3 :**Test relatif aux marqueurs d'activation**

5

Le test est effectué à partir de lymphocytes isolés d'un donneur comme décrit à l'exemple précédent, et ajustés à 2.10^6 cellules/ml dans le même milieu de culture.

Les lymphocytes sont ensuite incubés dans des tubes en polypropylène de 14ml à raison de 2ml/tube. On ajoute dans chaque puits une quantité d'oligonucléotides à tester préparés à l'exemple 1 (1 oligonucléotide / tube) suffisante pour obtenir une concentration en oligonucléotide 2 μ M. Après 3 jours d'incubation, les cellules sont réparties en 3 tubes micronic à raison de 10^6 cellules par tube. Après centrifugation, les cellules sont remises en suspension dans 100 μ l de tampon IF (ImmunoFluorescence) composé de PBS 0.1% BSA 0.01% Azide de sodium. On procède ensuite au marquage des cellules en ajoutant 5 μ l de chacun des anticorps fluorescents suivants:

- tube 1: CD20 PE/ CD69 FITC
- tube 2: CD20 PE/ CD25 FITC
- 20 - tube 3: CD20 PE/ CD86 FITC

Le CD20 est un marqueur des lymphocytes B.

Le CD69 est un marqueur d'activation précoce des lymphocytes B et T.

Le CD25 est un récepteur de l'Interleukine 2.

Le CD86 est une molécule de costimulation B7-2.

25 Après ½ heure d'incubation à 4°C; les cellules sont lavées et remises en suspension en tampon IF additionné de 0.5% de formol. Les cellules sont analysées sur un cytofluorimètre (FACScan) en double marquage, avec une fenêtre d'étude sur 5000 cellules CD20+ (lymphocytes B).

Les résultats obtenus sont illustrés sur la Figure 2 qui indique, pour chaque
30 oligonucléotide testé, le %age de lymphocytes B exprimant l'un des marqueurs testés. On constate que l'oligonucléotide selon l'invention ne contenant pas de motif CG est capable d'induire une augmentation de l'expression de certains marqueurs d'activation

(CD25, CD69, CD86) sur les lymphocytes B identique à celle mesurée pour l'oligonucléotide de l'art antérieur comprenant un tel dinucléotide CG. En effet, le pourcentage de lymphocytes B exprimant de tels marqueurs est du même ordre dans les 2 cas. Par contre, la séquence composée de 15 A a un pourcentage de lymphocytes B activés nettement plus faible.

Revendications

- 5 1. Oligonucléotide immunostimulant , caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence nucléotidique ayant la formule suivante
5' GAGAATTCTTTACCTTTTAT 3', dans laquelle T signifie Thymine, A Adénine, C Cytosine , G Guanine, et en ce qu'il est dépourvu de dinucléotide CG dans lequel la Cytosine C ne serait pas méthylée.
- 10 2. Oligonucléotide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend de 15 à 100 nucléotides.
3. Oligonucléotide selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce que
15 le motif 5' GAGAATTCTTTACCTTTTAT 3' est répété au moins 1 fois.
4. Oligonucléotide selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est capable d'induire la prolifération des lymphocytes B humains.
- 20 5. Oligonucléotide selon une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est capable d'accroître l'expression des marqueurs d'activation CD25 , du marqueur CD86, ou du marqueur CD69 sur les lymphocytes B humains.
- 25 6. Utilisation d'un oligonucléotide selon une des revendications précédentes pour la fabrication d'un médicament.
7. Utilisation d'un oligonucléotide selon une des revendications 1 à 5, pour la fabrication d'un immunostimulant humain.
- 30 8. Utilisation d'un oligonucléotide selon une des revendications 1 à 5, pour la fabrication d'un adjuvant vaccinal.

9. Utilisation d'un oligonucléotide selon une des revendications 1 à 5, pour la fabrication d'une composition vaccinale.
10. Composition vaccinale à usage humain, comprenant au moins un antigène
5 vaccinal, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un oligonucléotide selon une des revendications 1 à 5

1/1

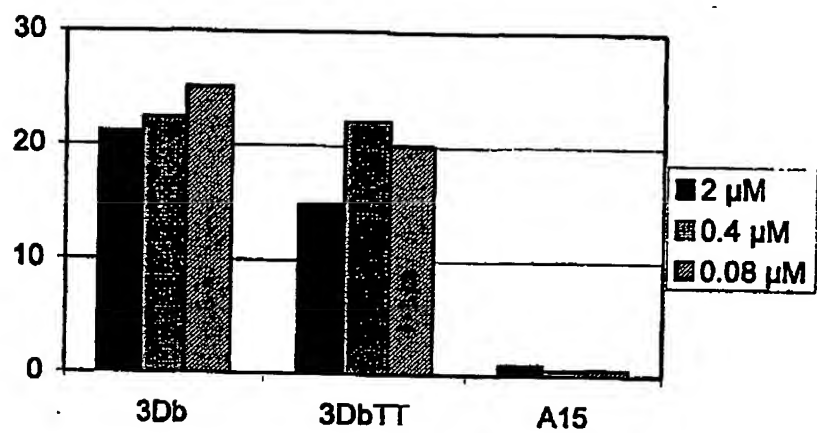


Figure 1

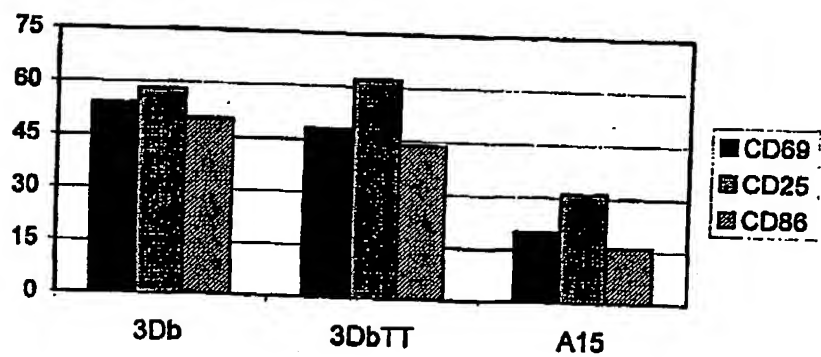


Figure 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.

PCT/FR 01/00349

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/11 A61K31/7088 A61K39/39 //A61P37/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 02555 A (UNIV IOWA RES FOUND) 1 February 1996 (1996-02-01) cited in the application page 14; table 1 SEQ ID 13	1-10
A	LIANG ET AL: "Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 98, no. 5, September 1996 (1996-09), pages 1119-1129, XP002130608 ISSN: 0021-9738 the whole document	1-10

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *S* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 June 2001

Date of mailing of the international search report

25/06/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijssen
Tel. (+31-70) 340-2040, Tlx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Andres, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.
PCT/FR 01/00349

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 98 52962 A (CAULFIELD MICHAEL J ;MERCK & CO INC (US)) 26 November 1998 (1998-11-26) cited in the application the whole document</p>	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. J. Appl. Application No

PCT/FR 01/00349

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9602555 A	01-02-1996	AU 713040 B	18-11-1999
		AU 1912795 A	16-02-1996
		CA 2194761 A	01-02-1996
		EP 0772619 A	14-05-1997
		JP 10506265 T	23-06-1998
		US 6008200 A	28-12-1999
		US 6207646 B	27-03-2001
WO 9852962 A	26-11-1998	AU 7589398 A	11-12-1998
		EP 0983289 A	08-03-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De. de Internationale No
PCT/FR 01/00349

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12N15/11 A61K31/7088 A61K39/39 //A61P37/04		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12N A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) CHEM ABS Data, STRAND		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 96 02555 A (UNIV IOWA RES FOUND) 1 février 1996 (1996-02-01) cité dans la demande page 14; tableau 1 SEQ ID 13	1-10
A	LIANG ET AL: "Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 98, no. 5, septembre 1996 (1996-09), pages 1119-1129, XP002130608 ISSN: 0021-9738 le document en entier	1-10
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"I" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"A" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">19 juin 2001</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">25/06/2001</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3018		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Andres, S</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De la Recherche Internationale No

PCT/FR 01/00349

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>WO 98 52962 A (CAULFIELD MICHAEL J ;MERCK & CO INC (US)) 26 novembre 1998 (1998-11-26) cité dans la demande le document en entier</p>	1-10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De: Je internationale No

PCT/FR 01/00349

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9602555 A	01-02-1996	AU 713040 B	18-11-1999
		AU 1912795 A	16-02-1996
		CA 2194761 A	01-02-1996
		EP 0772619 A	14-05-1997
		JP 10506265 T	23-06-1998
		US 6008200 A	28-12-1999
		US 6207646 B	27-03-2001
WO 9852962 A	26-11-1998	AU 7589398 A	11-12-1998
		EP 0983289 A	08-03-2000

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)